ECL RevelBlOt® Intense

Substrat chimioluminescent à signal persistant

OZYB002-1000 pour 1000 cm^2 de membrane (100 ml)
Stockage et stabilité : **un an à +4°C**

MANUEL D'UTILISATION

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

SOMMAIRE

DESCRIPTIF

ECL RevelBlOt® Intense est un substrat chimioluminescent de l'HRP dont le signal, très intense, est persistant (24h). Il permet la détection d'antigènes immobilisés sur membrane (Western blot). Le signal très intense permet d'obtenir un seuil de sensibilité inférieur au picogramme.

PRÉCAUTIONS

- Afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit de fond, il est recommandé :
  - D'optimiser les concentrations d'anticorps primaire et secondaire.
  - De tester plusieurs bloquants et de déterminer empiriquement celui qui convient le mieux.
  - D'ajouter du Tween®-20 dans les tampons de blocage et de dilution des anticorps afin de réduire les signaux non spécifiques.

Tout au long du protocole, la membrane ne doit jamais sécher. Assurez-vous, pour cela, d'utiliser la quantité idoine de tampons, qu'il s'agisse du tampon de blocage, du tampon de lavage, de l'anticorps dilué ou de la solution active **ECL RevelBlOt® Intense.**

- Il est recommandé de procéder aux incubations sur une plateforme d'agitation ou un système équivalent.
- Lors de la manipulation des films ou des réactifs de détection, porter des gants exempts de poudre ou utiliser des pinces.
- Ne pas utiliser d'azide de sodium (sodium azide) comme agent de conservation des tampons car c'est un inhibiteur de l'HRP.
- Utiliser des ustensiles propres. Les traces de rouille sur les ciseaux, pinces peuvent provoquer un bruit de fond élevé.
- La solution active **ECL RevelBlOt® Intense** est stable 24 heures à température ambiante. Si elle n'est pas utilisée extemporanément, conserver la dans une bouteille opaque.

LISTE DES COMPOSANTS

	Solution A - Bouteille marron	Solution B - Bouteille claire
OZYB002-1000 Pour 1000 cm^2 de membrane	50 ml Luminol/Enhancer	50 ml tampon Péroxide

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

SOLUTIONS DE TRAVAIL

- **Tampon de dilution** : Tris-Buffered Saline (TBS)
- **Tampon de lavage** : TBS-Tween 0,1%
- **Tampon de blocage** : dissoudre l'agent bloquant (lait en poudre non gras, BSA, etc..) dans du TBS-Tween 0,1%
- **Anticorps primaire** : préparer une solution mère à 1 mg/ml de l'anticorps spécifique de l'antigène à détecter dans le tampon de dilution. Pour obtenir la solution prête à l'emploi, diluer cette solution mère dans le tampon de blocage selon les recommandations de dilution du fabricant. En condition standard, la dilution est entre 1:1000 et 1:50 000 ou 20 ng/ml à 1 µg/ml.
- **Anticorps secondaire conjugué HRP** : pour obtenir la solution prête à l'emploi, diluer celui-ci dans le tampon de blocage. Suivre les recommandations du fabricant pour optimiser la dilution. En conditions standard, pour un anticorps conjugué HRP à 1 mg/ml, la dilution est entre 1:50 000 et 1:250 000 ou 4 à 20 ng/ml.
- **Solution active ECL RevelBlOt® Intense** : elle est obtenue en mélangeant à quantité égale (50/50) la solution A (Luminol/Enhancer, contenue dans la bouteille marron) et la solution B (tampon Péroxide, contenue dans la bouteille claire).

MATÉRIELS NÉCESSAIRES

- Cuves d'électrophorèse de protéines, appareil pour transfert sur membrane de Western blot.
- Membrane de nitrocellulose (ou PVDF) pour application Western blot.
- Plateforme d'agitation ou système équivalent.
- Détection :
  - Imageur doté d'une caméra CCD compatible avec la détection de signaux faibles et configuré pour le Western blot.
    ou
  - Film sensible aux rayons X, cassette et réactifs de fixation et de développement dédiés à l'autoradiographie.

PROTOCOLE ABRÉGÉ DE WESTERN BLOT

ÉTAPE 1	ÉTAPE 2	ÉTAPE 3
Séparation des protéines par éléctrophorèse	Transfert sur membrane	Blocage des sites non spécifiques
ÉTAPE 4	**ÉTAPE 5**	**ÉTAPE 6**
Incubation avec l'anticorps primaire spécifique de l'antigène à détecter	Premier lavage de la membrane	Incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire conjugué à l'HRP
ÉTAPE 7	**ÉTAPE 8**	**ÉTAPE 9**
Deuxième lavage de la membrane	Incubation 5 minutes avec la solution active **ECL RevelBlOt® Intense** (50/50 solution A et solution B)	Exposition de la membrane à un film sensible aux rayons X ou utilisation d'un imageur configuré pour le Western blot

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

PROTOCOLE COMPLET DE WESTERN BLOT

Étape 1 – Séparer la protéine portant l'antigène d'intérêt par électrophorèse.

Étape 2 – Transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose (une membrane PVDF ou d'autre nature peut être utilisée ; le cas échéant, des optimisations peuvent être requises).

Étape 3 – Incuber la membrane dans le tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante sur une plateforme d'agitation ou système équivalent. Alternativement, la membrane peut être incubée toujours dans le tampon de blocage sur la nuit, entre +2°C et +8°C.

Étape 4 – Éliminer le tampon de blocage. Incuber la membrane avec l'anticorps dilué pendant 1 heure sur une plateforme d'agitation ou système équivalent. Suivre les dilutions recommandées dans la section « Solutions de travail ».

Étape 5 – Laver la membrane dans le tampon de lavage sur une plateforme d'agitation ou système équivalent en faisant au moins 4 à 6 lavages de 5 minutes ou plus chacun. Chaque lavage est effectué à température ambiante avec du tampon de lavage frais. L'augmentation du volume de tampon et du nombre de lavage réduit le niveau de bruit de fond.

Étape 6 – Rincer la membrane et incuber sur une plateforme d'agitation ou système équivalent pendant une heure avec l'anticorps secondaire conjugué HRP dilué. Suivre les dilutions recommandées dans la section « Solutions de travail ».

Étape 7 – Laver la membrane (voir étape 5).

Étape 8 – Incuber la membrane dans la solution active **ECL RevelBlOt® Intense** (voir section « Solutions de travail ») pendant 5 minutes. Le volume total doit couvrir la membrane ; en condition standard, utiliser 0,1 ml de solution active **ECL RevelBlOt® Intense** par cm^2 de membrane. La solution active **ECL RevelBlOt® Intense** est stable 24 heures à température ambiante. L'incubation peut être réalisée à la lumière du jour ou dans une pièce normalement éclairée, mais pas à proximité d'une lumière intense. Si la solution active **ECL RevelBlOt® Intense** n'est pas utilisée extemporanément, protéger-la de la lumière en la conservant dans une bouteille opaque.

Étape 9 – Retirer la membrane de la solution active **ECL RevelBlOt® Intense**

- Évacuer l'excès de réactif de détection en tenant la membrane verticalement et en mettant un des bord de celle-ci en contact avec un papier absorbant.
- Envelopper la membrane dans du film plastique extra-fin transparent, type « Saran Wrap » ou équivalent. Prendre garde à éliminer l'excès de liquide et les bulles d'air. Rappel : la membrane ne doit jamais sécher (voir section « Précautions »).
- Révélation par autoradiographie sur film :
    - Placer la membrane ainsi protégée dans une cassette pour film sensible aux rayons X, côté protéines vers le haut. Le film sensible aux rayons X doit rester sec pendant l'exposition. Assurez-vous que la membrane humide ne soit jamais en contact avec le film.
    - Éteindre la lumière, placer le film sur le dessus de la membrane, fermer la cassette. Ne pas bouger le film durant le temps de l'exposition pour éviter tout artefact.
    - Exposer une minute. Le temps d'exposition peut varier pour optimiser les résultats.

- Retirer le film et placer immédiatement un nouveau film non exposé. Refermer la cassette. L'émission lumineuse continue 24 heures en décroissant au fil du temps. Il est donc possible si nécessaire de refaire une ou plusieurs autres expositions avec de nouveaux films. Cependant, la demi-vie de l'enzyme HRP est telle que des temps d'exposition plus longs peuvent être nécessaires.
- Développer le film avec les réactifs de fixation et dévelopement adéquats.

- Révélation imageur : l'appareil doté d'une caméra CCD doit être configuré pour le Western blot.
  - Le temps d'exposition varie d'une machine à l'autre et peut être plus long qu'avec un film autoradiographique.

Note : en fin de protocole, vous pouvez stocker la membrane enveloppée dans le film transparent type « Saran Wrap » à une température de +2 à +8°C. La membrane peut être déshybridée et réhybridée plusieurs fois.

PROTOCOLE DE DÉSHYBRIDATION / RÉHYBRIDATION

Étape 1 – Plonger la membrane dans le tampon de déshybridation (2-Mercaptoéthanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM, pH6,7) et incuber 30 minutes à 50°C. Si vous voulez travailler dans des conditions plus stringentes, l'incubation peut se faire à 70°C sur une durée supérieure à 30 min.

Étape 2 – Incuber la membrane 2 x 10 minutes à température ambiante dans du tampon PBS-Tween ou TBS-Tween. Remarque : à la suite de cette étape, la membrane peut-être incubée avec la solution active **ECL RevelBlOt® Intense** et ensuite exposée sur un film ou dans un imageur CCD pour vérifier l'absence de tout signal.

Étape 3 – Incuber la membrane dans le tampon de blocage (voir section « Solutions de travail ») pendant 1 heure à température ambiante.

Étape 4 – Reprendre le protocole de Western blot à l'étape 4.

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

1.Bruit de fond élevé

Causes possibles	Remarques / Solutions
Concentrations d'anticorps trop élevées	• Diluer les concentrations d'anticorps primaires et/ou secondaires
Agent bloquant inopérant	• Vérifier que le tampon de blocage a été préparé correctement • Assurez-vous que l'agent bloquant est bien présent dans les solutions diluées d'anticorps primaires et secondaires • Changer l'agent bloquant : 1 à 10% BSA en TBS-Tween ou PBS-Tween (préparé extemporanément) ; 0,5% à 3% de gélatine en TBS-Tween ou PBS-Tween (préparé extemporanément)
Lavage inefficace	• Augmenter le temps de lavage et le volume de tampon de lavage • Ajouter du Tween (si ce n'est pas déjà fait) • Augmenter la concentration de Tween dans le tampon de lavage
Tampons contaminés	• Assurez-vous que tous les tampons soient préparés extemporanément et filtrés
Contamination du matériel (cuves / appareil de transfert).	• Nettoyer ou remplacer les appareils
Problèmes de membrane	• Vérifier que la membrane est complètement immergée et reste bien humidifiée dans toutes les solutions • Utiliser des membranes de nitrocellulose (ou PVDF) de bonne qualité • Une membrane abîmée peut provoquer une fixation non spécifique des anticorps. Manipuler la membrane avec précaution à l'aide de gants exempts de poudre (voir section «Précautions») • Utiliser des pinces propres pour manipuler la membrane après lavage
Solution de détection **ECL RevelBlOt® Intense**	• Excès de Solution Active **ECL RevelBlOt® Intense.** Éliminer bien l'excès avec un papier absorbant avant de placer la membrane dans la cassette
Surexposition (film ou imageur)	• Exposer le film pendant un temps plus court (15 secondes peuvent suffire). Si la durée d'exposition est trop courte pour une manipulation aisée, réduire la concentration en anticorps • Laisser la membrane à l'obscurité avant d'exposer à nouveau. • Avec un imageur configuré pour le Western blot, il est possible d'utiliser un temps d'exposition court, puis d'accumuler le signal en série

2. Signal faible, aucun signal

Causes possibles	Remarques / Solutions
Protéines non transférées pendant le Western blot	• Colorer les protéines pour vérifier l'efficacité du transfert • Optimiser la concentration d'acrylamide dans le gel, le temps de transfert, le voltage à l'aide de marqueurs couvrant le poids moléculaire attendu (le poids moléculaire et le rayon de Stoke de la protéine affectent le transfert). Vous pouvez aussi utiliser une protéine connue comme contrôle positif
Quantité trop faible d'antigènes ou d'anticorps	• Augmenter la quantité de protéines portant l'antigène d'intérêt • Augmenter la concentration et le temps d'incubation de l'anticorps primaire. Une optimisation peut être nécessaire
Fixation faible de l'anticorps primaire	• Assurez-vous que l'antigénicité de la protéine n'a pas été affectée par les traitements inhérents à l'électrophorèse (SDS, urée, dénaturation, etc..). Vérifier la capacité de fixation de l'anticorps à l'antigène par Dot blot
HRP en excès	• Une quantité excessive d'HRP peut provoquer la déplétion du substrat **ECL RevelBlOt® Intense** et l'extinction rapide du signal. Diluer l'anticorps conjugué à l'HRP au moins 10 fois
Diminution d'activité de l'HRP ou du substrat **ECL RevelBlOt® Intense**	• Vérifier que la solution active **ECL RevelBlOt® Intense** et les solutions A (Luminol/Enhancer) et B (tampon Péroxide) ont été stockées et utilisées dans de bonnes conditions • Tester l'activité de l'HRP : préparer un petit volume (1 ml) de solution active **ECL RevelBlOt® Intense.** Dans le noir, y ajouter 1 µl d'anticorps conjugué HRP non dilué. Une lumière bleue doit être visible à l'oeil nu

3. Bandes non spécifiques

Cause possible	Remarques / Solutions
HRP en excès	• Diluer l'anticorps conjugué à l'HRP au moins 10 fois

4. Répartition inégale des signaux

Causes possibles	Remarques / solutions
Transfert de protéines inefficace	• Voir ci-dessus (aucun signal)
Membrane non immergée de manière homogène	• Recommencer avec une nouvelle membrane • Assurez-vous que la membrane soit en permanence entièrement recouverte durant les incubations
Contamination par des empreintes de doigts et/ou de la kératine	• Éviter de toucher la membrane. Utiliser des gants et des pinces
Présence de bulles entre le film et la membrane	• Éliminer les bulles. Exposer à nouveau

5. Bandes blanches (négatives) sur le film

Cause possible	Remarques / Solutions
HRP en excès	• Diluer l'anticorps conjugué à l'HRP au moins 10 fois

PRODUITS ASSOCIÉS

Ozyme recommande les produits suivants

Anticorps secondaires

Western Blot		
Anti-Lapin		
7074S	Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1 ml
DKXRB-003DHRPX	Donkey Anti-Rabbit IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
CKXRB-003DHRPX	Chicken Anti-Rabbit IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
SHXRB-003DHRPX	Sheep Anti-Rabbit IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
Anti-Souris		
7076S	Horse Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody	1 ml
RBXMU-003DHRPX	Rabbit Anti-Mouse IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
DKXMU-003DHRPX	Donkey Anti-Mouse IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
CKXMU-003DHRPX	Chicken Anti-Mouse IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg

Anti-Rat		
7077S	Goat Anti-Rat IgG, HRP-linked Antibody	1 ml
RBXRT-003DHRPX	Rabbit Anti-Rat IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
DKXRT-003DHRPX	Donkey Anti-Rat IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
CKXRT-003DHRPX	Chicken Anti-Rat IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate	1 mg
Anti-Biotine		
7075S	Goat Anti-Biotin IgG, HRP-linked Antibody	1 ml

Western Blot après immunoprécipitation		
5127S	Mouse Anti-Rabbit IgG (Conformation Specific) (L27A9) mAb (HRP Conjugate)	100 µl

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

Marqueurs de poids moléculaire

Non coloré

TAK3450Z	Protein Molecular Weight Marker (Low)	50 µl (200 lanes)
TAK3451Z	Protein Molecular Weight Marker (High)	50 µl (200 lanes)
TAK3452Z	Protein Molecular Weight Marker (Broad)	50 µl (200 lanes)

Coloré 1 couleur

7720L	Prestained Protein Marker Broad Range (Premixed Format)	350 lanes
7720S	Prestained Protein Marker, Broad Range (Premixed Format)	70 lanes

Coloré 4 couleurs

LON00193837	ProSieve QuadColor™ Protein Marker	500 µl

Gels prêts à l'emploi

Gamme PAGEr de gels Tris-Glycine (T-G). Nombreux formats et % de T-G en % unique ou en gradient.

Imageurs





Pour en savoir plus, contactez la division instrumentation d'Ozyme : 01 30 85 92 89 ou equipement@ozyme.fr

AVERTISSEMENT

Ce produit est à usage de recherche uniquement.

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr